

**Эффекты продления жизни и восстановления суточных локомоторных ритмов, вызванные у особей *Drosophila melanogaster* пан-нейрональной сверхэкспрессией генов центрального осциллятора в условиях различных режимов освещения**

И.А. Соловьёв<sup>1,2</sup>, Е.В. Добровольская<sup>2</sup>, М.В. Шапошников<sup>2</sup>,

М.А. Шептяков<sup>3</sup>, А.А. Москалев<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина

<sup>2</sup> Институт биологии КомиНЦ УрО РАН

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет)

[ilyasolovev-ksc@yandex.ru](mailto:ilyasolovev-ksc@yandex.ru)

### **Введение**

Экспрессия генов циркадных ритмов значительно изменяется в процессе старения животных. Мы проанализировали динамику возрастных изменений транскрипционной активности генов *cry*, *clk*, *per*, *cyc*, *tim* дрозофилы линии *w*<sup>1118</sup> на 5, 35 и 50 день, доступные данные по линии *Canton-S* и сравнили их с профилями экспрессии гомологичных и ортологичных последовательностей характерными для других животных, в результате было выявлено угнетение экспрессии генов центрального осциллятора с возрастом [1].

В настоящей работе предпринята попытка повлиять на процесс старения и формирования ответа организма на непрерывное освещение *D. melanogaster* посредством компенсации зависимой от возраста недостаточности экспрессии в нервной системе.

### **Материалы и методы**

При постановке эксперимента использовались линии:

1. *w*; *UAS-cry12/TM2*;
2. *w*; *UAS-HA-Clk #sit*;
3. *y, w*; *UAS-cry24/CyO*;
4. *w*; *UAS-per10*;
5. *w*; *UAS-per2.4*;
6. *w*; *P{UAS-CYC.HA}*;
7. *y, w*; *tim<sup>o</sup>*; *P{tim+HA}-2*;
8. Драйверная линия с мифепристон-индуцибельным, экспрессирующимся в нейронах транскрипционным фактором *y*; *P{ELAV-GeneSwitch-GAL4}*.

Для оценки статистической значимости различий по распределению смертности в выборках применяли критерий Колмогорова-Смирнова, для сравнения различий по

медианной продолжительности жизни – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Достоверность различий по максимальной продолжительности жизни (возрасту 90% смертности) оценивали с помощью метода Ванг-Аллисона.

Для сверхактивации генов использовалась UAS-GAL4 RU486-индуцибельная система. В ходе исследования были изучены параметры продолжительности жизни (ПЖ) дрозофил проживавших в режиме 12 ч свет/ 12 ч темнота, а также непрерывного освещения (на фоне индукции экспрессии в нервной системе).

Для оценки периода колебаний показателей локомоторной активности дрозофилы течение всей жизни использовалась установка DAM-system (TriKinetics Inc., USA), в которой мухи содержались на питательной среде в условиях постоянной темноты (в целях установления эндогенного ритма колебаний). При построении периодограмм использовался спектральный метод (преобразования Фурье).

### **Результаты**

Прирост медианной ПЖ составил 11,2 % у самцов линии со сверхэкспрессией гена *сус* ( $p < 0.001$ ). Увеличение времени 90%-ой смертности отмечалось у самцов сверхэкспрессирующих *per2.4* и составило 24% ( $p < 0.0001$ ). Самки со сверхактивированным *cry12* показали 11,8%-ый прирост времени 90%-ой смертности ( $p < 0.0001$ ). Самки линии со сверхэкспрессией гена *cry24* показали медианную продолжительность жизни на 33,3% больше контрольной группы ( $p < 0.0001$ ), 11% составил у них прирост времени 90% смертности ( $p < 0.0001$ ). Увеличение медианной ПЖ на 25% было обнаружено и в случае со сверхактивацией у самок *per2.4* ( $p < 0.05$ ), а также у линии, сверхэкспрессирующей *per10* на 6,4% соответственно ( $p < 0.05$ ). Отметим эффект 16,4%-ого увеличения возраста 90%-ой смертности у самок линии, сверхэкспрессирующей при индукции мифепристоном *tim* ( $p < 0.0001$ ), наряду с приростом медианной ПЖ у них же, составляющим 6,25% ( $p < 0.001$ ). Таким образом, получены убедительные доказательства способности генов циркадных ритмов снижать негативные эффекты непрерывного освещения.

При сверхэкспрессии *cry24* в головах самок период на 40-46 день удалось сохранить, в то время как контрольная группа в том же возрасте характеризовалась аритмичностью, пик 24 ч на спектре платообразный [Рисунок 1].

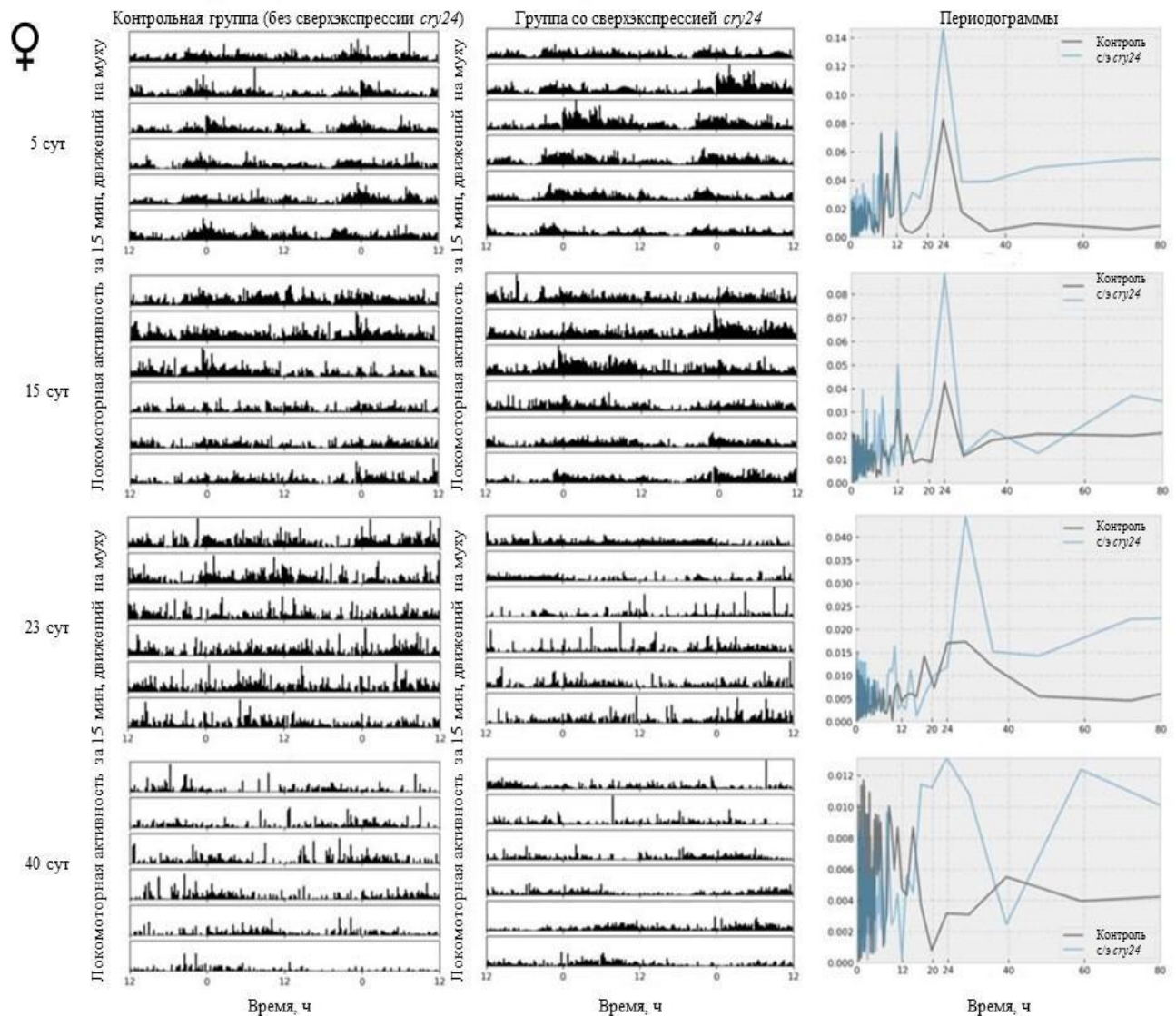


Рисунок 1 – Влияние сверхэкспрессии *cry24* (*UAS-cry24/ELAV-GS-GAL4*) на циркадные ритмы локомоторной активности самок *D. melanogaster*.

У самок линии *w*; *UAS-per10/ELAV* на 5-10 в контрольной группе к 40-му дню наблюдалось увеличение периода примерно до 30 часов, у опытной группы период оставался равным 24-м часам, что позволяет заключить, что компенсация возраст-зависимой недостаточности *per* нивелирует эндогенный возраст-зависимый десинхрониз [Рисунок2].

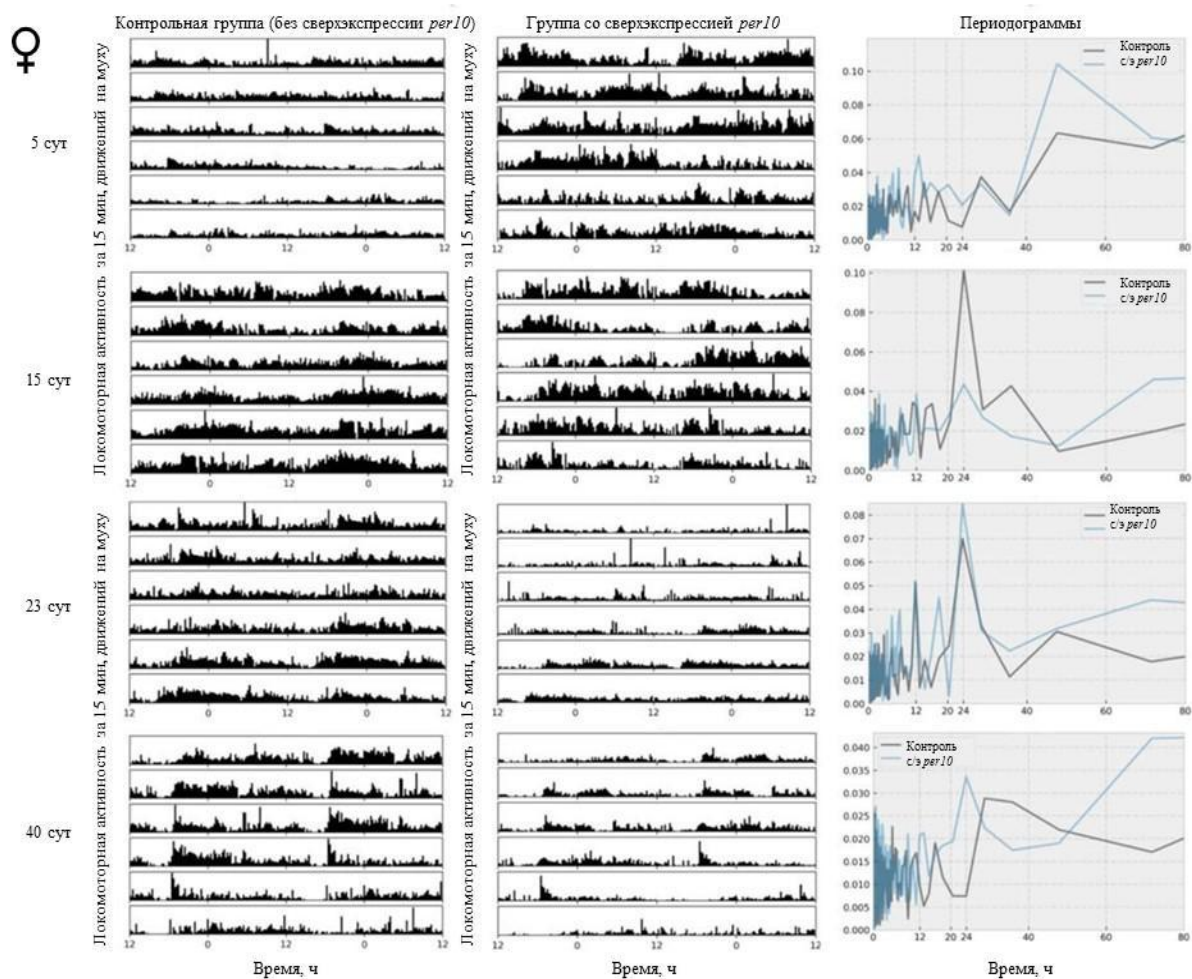


Рисунок 2 - Влияние сверхэкспрессии *per10* (UAS-*per10*/ELAV-GS-GAL4) на циркадные ритмы локомоторной активности самок *D. melanogaster*

## Обсуждение

Увеличение медианной продолжительности жизни при сверхэкспрессии *cry12*, вероятно, может быть объяснено с позиций биологии окислительно-восстановительных процессов, не столь давно стало известно, что высокая концентрация криптохромов приводит к генерации активных форм кислорода их функциональными единицами, хотя ранее эти флавопротеины считались антиоксидантами, так, вероятно, природа геропротекторного эффекта, наблюдаемого при сверхэкспрессии криптохрома сходна с гормезисом, регистрируемым при индукции у экспериментальных животных оксидативного стресса прооксидантами [2]. Следует отметить, что данный тезис находит подтверждение при анализе полученных в ходе изучения стрессоустойчивости данных, так сверхэкспрессируя криптохром на третьей (*cry12*), либо на второй хромосоме (*cry24*), мы осуществляем прекондиционирование организма плодовой мухи к оксидативному стрессу, вследствие чего выживаемость значительно выше именно у особей опытной группы, с индуцированной экспрессией трансгена.

Исследование Krishnan et al. (2009) [3] посвящено объяснению эффектов увеличения медианной продолжительности жизни дрозофил со сверхэкспрессией генов *per* в нервной системе, выявлен нейропротекторный потенциал его белкового продукта. В качестве аргументов авторы приводят сниженные показатели спонтанной двигательной активности и наличие свободнорадикальных повреждений белков и мембран клеток дрозофил, несущих нулевую мутацию по гену *per*. На одну из ведущих ролей в создании наблюдающегося эффекта также выдвигаются контролируемые циркадной системой гены-участники метаболизма такого внутриклеточного антиоксиданта, как глутатион, уровень экспрессии которых снижен в головах старых дрозофил [4] и, соответственно, при сверхэкспрессии в эксперименте выравнивается. Следует отметить, что ген *per*, если не брать во внимание вариант конструкции, единственный в настоящем исследовании при сверхэкспрессии продлевает жизнь особям обоих полов.

**Примечание:** Работа выполнена в рамках государственного задания по темам "Молекулярно-генетические механизмы старения, продолжительности жизни и стрессоустойчивости *Drosophila melanogaster*" № гос. регистрации АААА-А18-118011120004-5 и "Комбинация факторов различной природы (пониженная температура, отсутствие освещения, ограничительная диета и воздействие геропротектора) для максимального увеличения продолжительности жизни особей рода *Drosophila*" № 18-7-4-23, № гос. регистрации АААА-А18-118011120008-3.

#### Список литературы

1. Solovyov I. A., Dobrovol'skaya E. V., Moskalev A. A. Genetic control of circadian rhythms and aging //Russian journal of genetics. – 2016. – М. 52. – №. 4. – P. 343-361.
2. Arthaut L.D., Jourdan N., Mteyrek A., Procopio M., El-Esawi M., d'Harlingue A., Bouchet P.-E., Witczak J., Ritz T., Klarsfeld A., Birman S., Usselman R. J., Hoecker U., Martino C. F., Ahmad M. Blue-light induced accumulation of reactive oxygen species is a consequence of the *Drosophila* cryptochrome photocycle //PloS one. – 2017. – V. 12. – №. 3. – P. e0171836.
3. Krishnan N. et al. The circadian clock gene period extends healthspan in aging *Drosophila melanogaster* //Aging (Albany NY). – 2009. – V. 1. – №. 11. – P. 937.
4. Klichko V. I. et al. Aging alters circadian regulation of redox in *Drosophila* // Frontiers in genetics. – 2015. – V. 6. – P. 83.